

学校编码: 10384
学号: 21620070153832

分类号____密级____
UDC ____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

核受体 RAR γ 的胞质定位及其在肝癌中的致癌机制

RAR γ Cytoplasmic Localization and Its Oncogenic Potential
in Hepatocellular Carcinoma

颜廷东

指导教师姓名: 张晓坤教授
曾锦章教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 6 月

论文答辩时间: 2010 年 5 月

学位授予日期: 2010 年 7 月

答辩委员会主席: ____

评阅人: ____

2010 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

摘 要

视黄醇类活性物质 (retinoids) 是一类天然的或人工合成的维生素 A 的衍生物, 调节生长、分化和凋亡等多种生物学效应, 主要是通过 RXR 和 RAR 两类受体来介导, RXR 和 RAR 又各分为 α 、 β 和 γ 三种亚型。

经典的核受体作用机制认为这类蛋白是在核里作为转录因子来调控靶基因的表达。在 RAR 三个不同的亚型中, 我们发现 RAR γ 的亚细胞定位比较独特。受细胞培养条件的影响, 高密度、血清、生长因子刺激下可以使 RAR γ 转位并定位于细胞质。转染过表达的 RAR γ 也大量转位于细胞质。肿瘤细胞内 RXR α 切割形成的 C 端片段也会诱导 RAR γ 的胞质定位并抑制其转录功能。我们进一步发现, RAR γ 这种独特的亚细胞定位可能和 RAR γ N 端 A/B 域有关系, 当 RAR γ 缺失 A/B 域后, 主要定位在核内。这些结果提示 RAR γ 有不同于其它核受体的非基因型分子作用机制。

RAR 表达及功能的变化通常与肿瘤的发生和发展有密切的关系, 但是其潜在的分子机制仍不清楚。为了进一步研究 RAR γ 的生物学功能及非基因型作用机制, 在本课题中, 我们对 RAR γ 在肝癌细胞中的表达与作用进行了研究。我们发现, 在肝癌组织和一些肝癌细胞中, RAR γ 高度表达, 并且大量转位于胞质内。体外的细胞克隆形成实验表明, 过量表达 RAR γ 能引起细胞克隆形成能力的增强, 通过 siRNA 抑制 RAR γ 表达则显著降低肝癌细胞的克隆形成能力。肝癌裸鼠模型进一步证明, 当 RAR γ 高表达时, 裸鼠形成肿瘤的能力增强, 而抑制 RAR γ 的表达, 肝癌细胞形成肿瘤能力明显减弱。在研究这种分子机制的过程中, 我们发现, 肝癌细胞中 RAR γ 主要定位在细胞浆里, 通过与 PI3K 的 p85 α 亚基的相互作用, 激活 AKT 和 NF- κ B 信号通路, 从而引起肿瘤细胞的增值和生长。

以上结果表明, RAR γ 的亚细胞定位比较独特, 容易受细胞密度、生长因子以及 RXR 降解片段的影响定位在胞质里。肝癌细胞中过量表达且胞质定位的 RAR γ 通过非基因调控功能激活 PI3K/AKT 和 NF- κ B 信号通路, 促进细胞的增殖, 这些研究揭示了 RAR γ 的一条新的非基因型作用机制, 为我们在治疗肝肿瘤的过程中提供了一个新的药物靶点。

关键字: 核受体; RAR γ ; NF- κ B; PI3K/Akt; 肝癌; 非基因型功能; 信号转导

ABSTRACT

The pleiotropic effects of retinoids (natural and synthetic vitamin A derivatives) are mediated by two classes of the nuclear receptor family, the retinoic acid receptors (RARs) and the retinoid X receptors (RXRs), both of which are encoded by three distinct genes, α , β , and γ .

Nuclear receptors are known to mainly reside in the nucleus, acting as transcription factors to positively or negatively regulate transcription of target genes. However, we found that among the subtypes of RAR (α , β , and γ), RAR γ was frequently localized in the cytoplasm depending on its expression level and culture conditions. We showed that RAR γ was cytoplasmic in confluent cells, or when cells were released from serum-depletion or treated with growth factors. We also observed that ectopically overexpressed RAR γ was mainly cytoplasmic. Our mutagenesis studies revealed that a C-terminal fragment of RXR α potently prevented RA-induced RAR γ nuclear localization and transcriptional function. Furthermore, our results showed that the cytoplasmic retention of RAR γ was due to the presence of its unique N-terminal A/B domain. Deletion of the N-terminal A/B domain largely impaired its cytoplasmic localization. These findings suggest that RAR γ may have extranuclear actions.

Abnormal expression and function of RARs are often involved in the growth and development of cancer. However, the underlying molecular mechanisms remain largely elusive. In studying the possible extranuclear action of RAR γ in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells, we found that levels of RAR γ were significantly elevated in tumor tissues from a majority of HCC patients and in HCC cell lines. Overexpression of RAR γ promoted colony formation of HCC cells *in vitro* and the growth of HCC xenografts in animals. In HepG2 cells, transfection of RAR γ enhanced, whereas downregulation of RAR γ expression by siRNA approach impaired, the effect of retinoic acid (RA) on inducing the expression of α -fetoprotein, a protein marker of hepatocarcinogenesis. In studying the possible mechanism by which

overexpression of RAR γ contributed to liver cancer cell growth and transformation, we observed that RAR γ resided mainly in the cytoplasm of HCC cells, interacting with the p85 α regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). The interaction between RAR γ and p85 α resulted in activation of AKT and NF- κ B, critical regulators of the growth and survival of cancer cells.

Together, our results reveal a new nongenomic action of RAR γ , which plays a growth stimulatory role in HCC cells through its activation of the PI3K/AKT and NF- κ B signaling pathways, and provide a molecular basis for developing agents targeting this nongenomic RAR γ action for HCC prevention and therapy.

Key words: nuclear receptor; RAR γ ; NF- κ B; PI3K/AKT; hepatocellular carcinoma, non-genomic action; signal transduction

目 录

前言

1. 核受体.....	1
2. RAR 和 RXR 的基因型功能	3
3. RAR 和 RXR 的非基因型功能.....	4
4. NF- κ B 信号通路.....	7
5. PI3K/AKT 信号通路.....	10
6. 研究的目的、内容和意义.....	12

材料与方法

1. 实验材料	14
2. 实验方法	21

实验结果与分析

(一) RAR γ 独特的胞质定位

1. RAR γ 的亚细胞定位受生长条件的调节	37
2. 转染的 RAR γ 主要定位在胞质里	39
3. RAR γ 的 N 端 A/B 域对其胞质定位是必须的.....	42
4. RXR α 的 C 端片段对 RAR γ 胞质定位和转录的影响.....	45

(二) 肝癌中 RAR γ 的致癌性研究

1. 肝癌组织和肝癌细胞中 RAR γ 过量表达.....	47
2. 肝癌组织和细胞中 tRXR α 的表达.....	49
3. RAR γ 介导 RA 的生长刺激效应	50
4. RAR γ 增强肝癌细胞的克隆形成能力	52
5. RAR γ 促进肝癌裸鼠移植瘤模型的形成.....	53
6. 不同的药物对肝癌裸鼠移植瘤模型的影响.....	55
7. RAR γ 激活肝癌中的 NF- κ B.....	58
8. RAR γ 和 p85 α 的相互作用激活 PI3K/AKT	60
9. RAR γ 激活 AKT 促进 NF- κ B 活性.....	62

讨论.....	65
结论.....	70
参考文献.....	71
致谢.....	82

厦门大学博士论文摘要库

Table of Content

Introduction

1、 Nuclear receptors	1
2、 RAR and RXR Genomic Action	3
3、 RAR and RXR Nongenomic Action	4
4、 NF- κ B signal pathway	7
5、 PI3K/AKT signal pathway.....	10
6、 Aim and significance	12

Materials and Methods

1、 Materials	14
2、 Experimental methods	21

Results

1、 A Unique Cytoplasmic Localization of RAR γ	37
1.1、 Regulation of intracellular localization of RAR γ by cell density, serum concentration, and growth factors	37
1.2、 Ectopically expressed RAR γ resides in the cytoplasm	39
1.3、 Cytoplasmic localization of RAR γ requires the presence of its N-terminal A/B domain.....	42
1.4、 C-terminal fragment of RXR α prevents RA-induced RAR γ nuclear localization and transcriptional function	45
2、 Oncogenic Potential of RAR γ in Hepatocellular Carcinoma.....	47
2.1、 Overexpression of RAR γ in HCC	47
2.2、 Expression of tRXR α in HCC	49
2.3、 Distinct growth regulatory responses of RA in HepG2 and Hep3B cells.....	50
2.4、 Colony formation assays of RAR γ in HCC cells.....	52

2.5、RAR γ promote tumor growth in HepG2 xenografts.....	53
2.6、Some drug regulate RAR γ expression in HepG2 xenografts.....	55
2.7、ATRA activates NF- κ B signaling.....	58
2.8、The interaction of RAR γ and P85 α	60
2.9、RA induces AKT and I κ B α phosphorylation.....	62
Discussion	65
Conclusion	70
Reference	71
Acknowledgement	82

英文缩略词

英文缩写	英文全名	中文名称
NR	nuclear receptor	核受体
AR	androgen receptor	雄激素受体
PR	progesterone receptor	孕激素受体
GR	glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
MR	mineralocorticoid receptor	盐皮质激素受体
RXR	retinoid X receptor	视黄素 X 受体
RAR	retinoic acid receptor	视黄酸受体
TR	thyroid hormone receptor	甲状腺激素受体
VDR	vitamin D receptor	维他命 D3 受体
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor	过氧化物酶激活受体
DBD	DNA-binding domain	DNA 结合结构域
LBD	ligand-binding domain	配体结合区
AF	Activation function,	转录激活功能域
ATRA	All-trans-retinoic acid ()	全反式视黄酸
9-cis-RA	9-cis retinoic acid	9-顺视黄酸
PML	promyelocytic leukemia	早幼粒细胞白血病
CREB	cAMP-response element-binding protein	
NF-κB	nuclear factor-kappa B	
RHD	Rel homology domain	Rel 同源结构域
IκB	inhibitory protein of NF-κB	
TRAF	TNFR-associated factor	
RIP	receptor interacting protein	
IKK	IκB kinase	
PI	phosp hatidylinositol	磷脂酰肌醇
PIP2	phosphatidylinositol 4 , 5 biposphate	
PIP	phosp hatidylinositol 4 phosphate	
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
siRNA	Small interference RNA	
CP	cyclophosphamide	环磷酰胺
AFB1	aflatoxin	黄曲霉素
MTT	(3-[4,5-dimethylthiazol-6-yl] -6,5-diphenyltetrazolium bromide)	
NES	nuclear export signal	出核信号
NLS	nuclear localization sequence	核定位序列
T	Tumor	癌
S	Surrounding	癌旁

前 言

1 核受体

1.1 概述

核受体 (nuclear receptor, NR) 是一类在生物体内广泛分布的、表达于胞浆或细胞核内的蛋白质, 它可被类固醇、维生素 A 和甲状腺激素等脂溶性小分子调节, 调控细胞生长、增殖、分化、代谢、免疫反应和凋亡等几乎所有的生物学过程^[1-8]。其成员众多, 构成了一个大家族, 根据配体的不同, 又可分为三大类: 第一类是类固醇受体家族, 包括雄激素受体 (androgen receptor, AR)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 和盐皮质激素受体 (mineralocorticoid receptor, MR) 等; 第二类受体能够与视黄素 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 形成异源二聚体, 包括视黄酸受体 (retinoic acid receptor, RAR)、甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, TR)、维他命 D3 受体 (vitamin D receptor, VDR) 和过氧化物酶激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 等; 第三类是孤儿受体 (orphan nuclear hormone receptors)^[9], 到目前为止未发现其特异性生理配体, 但与核受体结构上很相似, 因此被并入核受体超家族。目前已经发现并命名的核受体的系统进化树^[10], 见图 1。.

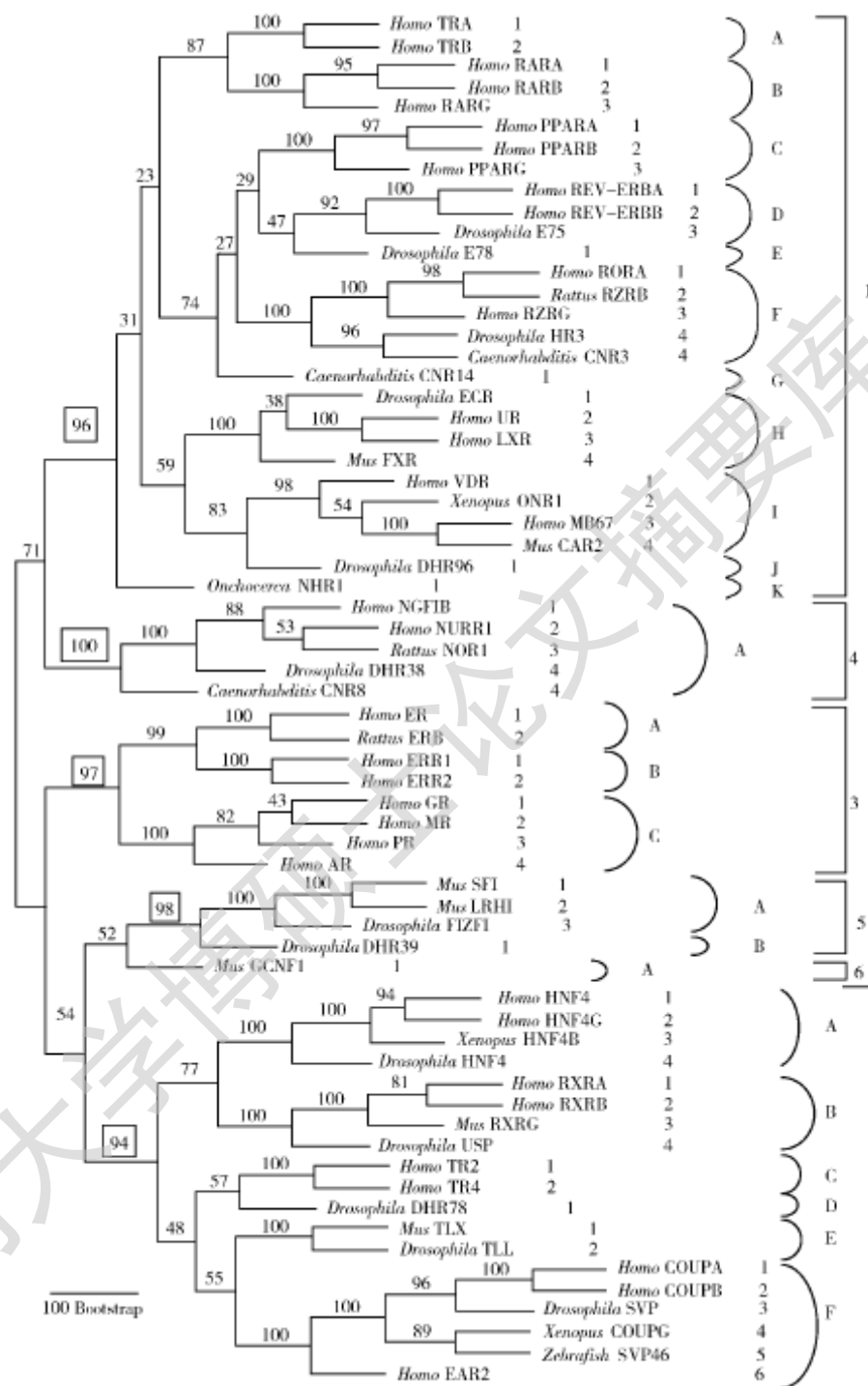


图1 核受体系统进化树（引自文献 10）

Fig. 1 Phylogenetic tree of nuclear receptors

1.2 核受体的结构和功能

核受体具有较为固定的结构，见图 2。一般分为六个区，即 A、B、C、D、E 和 F 区^[11-13]。A/B 区的长度不一，由 50 至 500 个氨基酸组成。C 区为高度保守

的 DNA 结合结构域 (DNA-binding domain, DBD), DBD 区包含两个高度保守的锌指结构。在 DNA 结合区 (C 区) 和配体结合区 (E 区) 之间有一较短且不保守的结构称为铰链区 (D 区), 该区含有核定位信号肽 (NLS)^[14]。E 区, 即配体结合区 (ligand-binding domain, LBD), 是最大的结构域, 其序列高度保守, 以保证选择型配体的识别。E 区的二级结构是由 12 个 α 螺旋组成, 核受体的配体结合区在 E 区。有些核受体还包含一个 F 区, 在 E 区的 C 端外, F 区的序列高度可变, 其结构和功能尚不十分清楚^[15]。此外, 在 A/B 区域和 E 区域各包含一个转录激活功能域(activation function, AF) 分别称为 AF-1 和 AF-2, 它们主要负责转录起始相关蛋白的招募^[16]。



图 2 核受体结构模式图

DBD: DNA 结合结构域; LBD: 配体结合结构域

Fig.2 Structure of nuclear receptors

针对不同的刺激信号, 核受体与不同的配体和辅调节因子的相互作用赋予了它功能的多样性, 当配体和受体结合后, 受体的空间构型发生变化, 诱导形成同源或异源二聚体, 从而影响细胞的各种生理过程^[17-18]。

2 RAR 和 RXR 的基因型功能

视黄醇类活性物质 (retinoids) 是一类天然的或人工合成的维生素 A 的衍生物, 调节多种生物学效应, 包括视觉、生长、免疫、再生和自稳态的维持。主要是通过 RAR 和 RXR 两类受体来起作用。RAR 和 RXR 又各分为 α 、 β 和 γ ^[19] 三种亚型。全反式视黄酸 (All-trans-retinoic acid, ATRA) 激活 RARs, 而 9-顺视黄酸 (9-cis retinoic acid, 9-cis-RA) 可同时激活 RXRs 和 RARs。

RXR 在核受体超家族成员中是比较特殊的, 除了能形成 RXR/RAR 异源二

聚体和 RXR/RXR 同源二聚体外, RXRs 还可以与一些其它的核受体形成异源二聚体, 例如: 维生素 D3受体 VDR、甲状腺激素受体 TR、过氧化物酶激活受体 PPAR、肝 X 受体和一些如 Nur77的孤儿受体。RXR 的这种独特的异源二聚化功能为视黄酸信号通路和其他的各种内分泌信号通路间的交互联系提供了分子基础。

RAR 和 RXR 调控细胞分化、生长、凋亡、体内众多生理代谢过程及机体的生长发育等众多的重要生命过程, RAR 和 RXR 及其调控的信号通路的紊乱可导致肿瘤等许多病理过程。因而 RAR 和 RXR 在人体健康及疾病中具有重要作用, 是药物开发的潜在靶点。早在1991 年, 研究者发现在急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 细胞中15和17号染色体之间发生易位^[20], 导致早幼粒细胞白血病 (promyelocytic leukemia, PML) 基因和视黄酸受体 α (retinoic acid receptor α , RAR α) 基因融合, 表达 PML-RAR α 融合蛋白^[21-26], 提示 RAR α 功能的改变是引起早幼粒细胞白血病的关键因素。随后, 在对 APL 的研究过程中, 又发现了另外一些和 RAR α 融合的基因。这些研究表明, 病理状态下, 不正常的 RAR α 干扰了正常 RAR α 对细胞分化和增生调节的影响。临床上 ATRA 已经广泛用于治疗白血病。

经典理论认为, 在与配体结合后, RARs 和 RXRs 形成的异源二聚体与 DNA 上特定的结合元件 RARE 结合, 启动靶基因的转录, 从而行使特定的生物学功能。在没有配体存在的情况下, RXR/RAR 异源二聚体与 DNA 形成的复合物与辅阻遏因子结合在一起, 阻滞了正常的转录功能。配体结合后, 辅阻遏因子被释放并且一些激活因子被招募到转录复合物上, 启动基因的转录。和其它核受体一样, RAR 和 RXR 可以不直接与 RARE 结合而调节基因的表达, 这主要是通过与一些像 AP-1和 NF- κ B 这样的转录因子发生蛋白之间相互作用而发生的^[27,28]。

比较 RARs 的三种亚型 α 、 β 和 γ 的同源性, 我们可以发现, C 区的同源性最高, 为94 % 和97 %, E 区的同源性为84 % 和90 %, 而 A/B 区和 F 区几乎没有明显的同源性^[29]。RAR 的各亚型在胚胎发育的过程中, 以及在成熟组织中的表达情况也不一样, 这些结构和时空上表达的不同, 提示我们不同的亚型可能介导不同的生物学功能。

在 APL 细胞中, ATRA 诱导 RAR 和 RXR 形成二聚体, 并激活靶基因的转

录, 恢复 RAR α 诱导细胞分化的功能。另外, RAR α 通过结合到 RAREs 上激活转录, 在骨髓细胞的分化过程中起至关重要的作用^[21-26]。许多研究表明, 在雌激素依赖性的乳腺癌细胞中, RAR α 介导 ATRA 对细胞的生长抑制作用, 而在雌激素非依赖性的细胞中, ATRA 失活导致 RAR α 表达的下降。在雌激素依赖性并且对 ATRA 敏感的乳腺癌细胞 (如 ZR-75-1, MCF-7 和 T-47D) 中, RAR α 呈现高表达, 而雌激素非依赖性且对 ATRA 不敏感的 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 细胞中, RAR α 低表达^[30]。另外, 在 ZR-75-1 和 T-47D 等对 ATRA 敏感的细胞中, ATRA 的诱导上调了 RXR β 的表达; 稳定转染了 RAR α 的 MDA-MB-231 细胞, 其 RAR β 表达也增强^[31], 而转染 RAR β 到 MDA-MB-231 细胞中, 恢复了 ATRA 的抑制细胞生长的功能^[32]。这些结果表明, RAR β 可能调控 RAR α 的生长抑制作用。

相对 RAR α 和 RAR β 而言, 对 RAR γ 的认识还不是太深入, RAR γ 主要是和生长分化等生物学功能相关。例如, 有研究报导在鼠角质细胞中 RAR γ 在 Ras 诱导肿瘤形成、RA 诱导的细胞周期停滞和凋亡中起重要作用^[33]。在调节造血干细胞自我更新和分化的平衡中, RAR γ 起重要作用^[34]。在转录调控水平, 过表达 RAR γ 能抑制 RA 靶基因的转录活性^[35]。在 F9 细胞中, 一些 RAR γ 的靶基因已经被鉴定出来^[36]。但随着研究的深入, 人们发现 RAR γ 等核受体还有另外的一些生物学功能不能用经典的基因型功能来解释, 说明核受体还存在着非基因型功能作用机制。

3 RAR 和 RXR 的非基因型功能

核受体的基因型功能是传统而经典的, 主要是通过核受体与 DNA 上相应元件的直接相互作用来调节靶基因的表达, 还能通过与一些转录因子之间相互作用, 而不通过直接与 DNA 结合来调节基因的表达。然而, 近十多年来根据核受体的基因型功能进行药物开发并未能取得突破性的进展, 说明我们对核受体的作用机制的认识有待于进一步创新。最近十年来, 人们逐渐认识到, 核受体能发挥如此广泛生物学功能的重要原因之一, 是它能够定位到细胞内不同的亚细胞结构上, 通过与不同蛋白之间的直接相互作用, 快速调控细胞内信号转导通路。人们发现, 一些视黄素快速激活的反应, 例如 GTPase Rac^[37]、PKC^[37]、ERK2^[39]、CREB^[40,41] (cAMP-response element-binding protein) 和磷酸肌醇-3 激酶

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库